

BJ

特平 8-103240

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名 住友製薬株式会社

日 本 国 特 許 庁

17.01.97

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 6 年 3 月 2 8 日

REC'D 31 JAN 1997

出 願 番 号
Application Number:

平成 8 年特許願第 1 0 3 2 4 0 号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant (s):

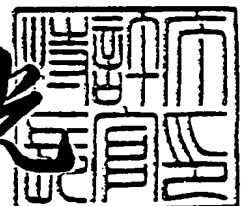
住友製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 6 年 1 2 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



特平 8-103240

【書類名】 特許願

【整理番号】 132293

【提出日】 平成 8年 3月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/19

【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子 F G F - 1 0

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市左京区吉田下阿達町 京都大学薬学部内

 【氏名】 伊藤 信行

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 根来 尚温

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 勝又 隆

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 田頭 秋三

【特許出願人】

 【識別番号】 000183370

 【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

 【代表者】 武内 正康

 【電話番号】 06-466-5214

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 平成 7年特許願第345689号

特平 8-103240

【出願日】 平成 7年12月 7日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】明細書

【発明の名称】線維芽細胞増殖因子 FGF-10

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1もしくは配列番号2に示すアミノ酸配列のポリペプチドである線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列を包含する組み換えDNA。

【請求項2】 配列番号：3もしくは配列番号4に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する請求項1記載のDNA。

【請求項3】 請求項1のDNAを担持する発現ベクター。

【請求項4】 請求項3の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

【請求項5】 宿主が動物細胞または大腸菌である請求項4記載の形質転換体。

【請求項6】 請求項4の形質転換体を使用することを特徴とする組換え線維芽細胞増殖因子の製造方法。

【請求項7】 配列番号：1もしくは配列番号2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

【請求項8】 請求項5の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1もしくは配列番号2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規な線維芽細胞増殖因子（以下、FGFと略称）およびその組換え製法に関する。

【0002】

【従来の技術】 FGFは、1970年代に血管新生因子として発見された。当初、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）や塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）が研究され、その構造や広範な細胞増殖促進作用が明らかにされてきた〔D. Gospodarowics 他；ネイチャー（Nature）249巻123頁（1974）、Burgess, W. H. および Maciag, T. ; Ann. Rev. Biochem. 58巻575-606頁（1989）、SU

ZUKI, F. ; Clinical Calcium. 4巻1516-1517頁(1994)〕。 現在では、計9種類のFGF類が報告されており、それぞれのクローニング、構造解析も成されている〔細胞、27巻9号341-344頁(1995)〕が、それ以外のFGF類の存在については可能性のみ示唆されていた。

【0003】

一方、bFGFやaFGFはその広範な細胞増殖促進作用を利用して、神経系、血管系や骨代謝系の疾患において、有望な治療剤となる可能性が検討されているが、現在もまだ、臨床治験に於ける有用性が証明されるには至っていない。新規なFGFでの同様の研究が待望されている。

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、新規なFGFの遺伝子を発見し解析することによって、その組換蛋白の工業的生産方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】発明者は、未知のFGFのDNAについて鋭意検討を行った結果、全く新しいタイプのFGF（以下、FGF-10と略称する）のDNAを取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下に示すように、FGF-10をコードするDNA、当該DNAを担持した発現ベクター、形質転換体、それらを用いた組換蛋白の製造方法、および組換蛋白に関するものである。

【0005】

(1) 配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列のポリペプチドである線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列を包含する組み換えDNA。

(2) 配列番号：3もしくは配列番号：4に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する請求項1記載のDNA。

(3) (1)のDNAを担持する発現ベクター。

(4) (3)の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

(5) 宿主が動物細胞または大腸菌である(4)記載の形質転換体。

(6) (4) の形質転換体を使用することを特徴とする組換線維芽細胞増殖因子の製造方法。

(7) 配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換線維芽細胞増殖因子。

(8) (5) の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換線維芽細胞増殖因子。

【0006】

本明細書において、用語の意味または定義は下記の通りである。

・FGF-10：配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸配列またはその主要部分を包含する哺乳類の産生する線維芽細胞増殖因子。主要部分とは、前記配列から、シグナル（プレ）配列またはプロ配列が除かれたマチュア蛋白アミノ酸配列を意味する。すなわち、配列番号：1における37位グルタミン（Gln）から215位セリン（Ser）に到る179アミノ酸残基からなるアミノ酸配列、または配列番号：2における38位グルタミン（Gln）から208位セリン（Ser）に到る172アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。

なお、現在公知の技術により、配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸配列またはその主要部分の一部のアミノ酸残基を欠失、置換あるいは付加させた蛋白質を製造することが可能であり、ランダムスクリーニングあるいは他のFGFファミリー蛋白に於ける配列改変研究の知見から、本件発明のFGF-10と生理活性の点で同質の改変蛋白質を創製することが可能である。これらの改変蛋白質も線維芽細胞増殖因子活性を示すかぎり、本件発明の技術範囲に属する物である。また、FGF-10は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列の50-52位に存在するAsn-Ser-Ser、203-205位のAsn-Thr-Ser、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の51-53位に存在するAsn-Ser-Ser、196-198位のAsn-Thr-Ser、二か所に糖鎖結合部位を有する蛋白質であるが、一般的には、糖鎖の有無に関わり無く生理活性を有する。公知の宿主の選択により糖鎖の種類を変更すること、あるいは除去することができるが、これらの糖鎖改変蛋白質も下記の線維芽細胞増

殖因子活性を示すかぎり、本件発明の技術範囲に属する物である。

・線維芽細胞増殖因子活性：細胞増殖刺激作用、造血幹細胞増殖作用、血管新生作用など種々の細胞に対する細胞増殖促進作用、細胞分化誘導作用や細胞外マトリックス改変作用などの分化調節作用、神経細胞の生存維持作用等、多岐に渡るFGF類の生理活性のうちの少なくとも一種〔臨床検査 38巻、11号、219-221頁（1994年 増刊号）〕。

【0007】

以下、本発明をより詳細に説明する。

〔FGF-10遺伝子の取得〕

本発明のFGF-10をコードするDNAは、公知の遺伝子工学的方法にて製造出来る。すなわち、哺乳類の生体組織あるいは培養細胞から、mRNAを単離し、それから二本鎖cDNAを得ることができる。さらに、このcDNAをプライマーに用いて、PCR法を行い、増幅し、適宜配列を決定できる。これらはいずれも専用キットが市販されている。なお、mRNAの原料の生体組織や培養細胞は特に種類を限定されるものではないが、特に、約14日令のラット胎児を用いる方法が好適である。肺や関節組織におけるmRNA発現が比較的多いため、肺細胞、骨／軟骨由来細胞由来の培養細胞等も用いうる。市販の成人ヒト肺由来ポリ(A)+RNA〔クロンテック社〕などを使用する方法も簡便で好ましい。

【0008】

また、本特許明細書に開示のFGF-10をコードするDNA配列の中から、適当な配列をDNAプローブとして用い、種々の生体由来のcDNAまたはゲノム遺伝子ライブラリーからクローニングすることができる。

遺伝子ライブラリーは常法に従って、下記のように調製する。1. 動物組織を凍結粉末化したものをRNAase及びプロテアーゼ処理し、高分子量DNAを沈澱させて得る。DNA抽出物については、市販のものが利用できる〔クロンテック(c l o n t e c h)社等〕。2. 制限酵素(EcoRI等)で部分的に切断し、エタノール沈澱でDNA断片を得る、3. DNAリガーゼを用いて、λファージにDNA断片を挿入し、4. 市販のin vitroパッケージングキットを用いて、パッケージングを行い、遺伝子ライブラリーを作る。

DNAプローブは、本特許明細書に開示のFGFファミリー蛋白をコードするDNA配列の中から、特異性の高い配列を選ぶ。常法により、化学合成し、 ^{32}P 等でラベルすることができる。

【0009】

〔FGF-10蛋白質の製造〕

こうして得られたFGF-10のcDNAを組み込む発現ベクターとしては、適当な大腸菌、枯草菌、酵母、動物昆虫細胞等の宿主内で増殖できるプラスミドやファージが選ばれるが、例えば、大腸菌由来のpBR322、pBR325〔ジーン (Gene) 4巻121頁 (1978)〕、枯草菌由来pUB110〔バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 112巻, 678頁 (1983)〕、COS細胞に好適なpCDM8等が挙げられる。cDNAをプラスミドに組み込む方法としては、常法が、マニアティス (T. Maniatis) 他、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning)、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (Cold spring harbor lab.) 239頁 (1982) に記載されている。

【0010】

宿主は、ベクターの導入により形質転換され、FGF-10を産生できる生物や培養細胞であれば、特に限定されない。細菌としては、大腸菌、枯草菌 (バチルス類) 等、酵母としては、サッカロマイセス属、トルラ属、ピキア属等、動物細胞としては、CHO細胞、NSO細胞等が代表例である。培養昆虫細胞、真菌、植物細胞、単細胞系だけでなく、目的蛋白質遺伝子を組み込まれた昆虫や哺乳類、植物も宿主の範疇に入る。

【0011】

形質転換体から、公知の方法、例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法〔ジーン (Gene), 10巻 63頁 (1980)〕およびDNA塩基配列決定法〔プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 74巻560頁 (1977)〕を用い、所望のクローンを選出する。また、COS細胞にて一過性に発現さ

せ、培養上清の生理活性を評価してクローン選択することも可能である。

【0012】

発現されたFGF-10蛋白の生理活性は、常法により容易に検出できる。たとえば、公知のFRSK細胞など、上皮細胞の増殖促進作用を測定することにより評価できる。

【0013】

クローン化されたDNA含有プラスミドは、そのままあるいは制限酵素で切り出して利用することが可能であり、種々の宿主に適応した発現ベクターに組み込んで発現させ、FGF-10蛋白を大量に製造することができる。発現方法は特に制限されず、細菌を用いた融合発現、分泌発現および直接発現、また真核細胞を用いた発現など適宜、当該分野で公知の組換蛋白生産技術が応用しうる。

【0014】

組換技術により生産されたFGF-10蛋白は、生化学の分野で常用される精製方法にて精製が可能である。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLC、硫酸沈澱、限外濾過、SDS-PAGEなどが適宜組み合わせて用いられるが、FGF類の場合、特にヘパリン等のリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィー、抗体カラムクロマトグラフィーなどが大量精製に好適である。FGF-10蛋白に対する抗体は、ポリクローナル、モノクローナル共に、自体公知の方法で作製し得る。FGF-10特異的抗体は抗体カラムに使用出来るだけでなく、ELISA等の免疫化学的定量法に使用できる。

【0015】

【作用】

上述の方法で得られたFGF-10蛋白は、細胞増殖促進作用を始めとする種々の生理作用を有しており、創傷治癒促進剤、循環不全治療剤、神経生存維持剤、発毛促進剤などの医薬用途に用いうる。特に、成体哺乳類の軟骨組織での発現が認められており、骨折治癒等の骨疾患治療剤、軟骨・結合組織の損傷治療剤への応用が考えられる。また、細胞増殖促進用の実験試薬としても使用しうる。

【0016】

【実施例】 以下の実施例によって、本発明をさらに詳細に説明するが、本発

明はそれに限定されるものではない。

〔実施例1〕 FGF-10遺伝子の構造解析

・ラット遺伝子ライブラリーの調製

14日齢ウイスターラット胎児全組織から、常法〔Chomoczynski他、Anal. Biochem. 162巻, 156-159頁(1987)〕に従い、mRNAを調製した。そのラット胎児mRNAを鋳型に、ランダムプライマー(6mer)をプライマーとして、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素を用いてラット胎児cDNAを調製した。すなわち、ラット胎児ポリ(A)+RNA(5 μ g)を300ユニットのMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBO-BRL)、15ユニットのhuman placenta RNase inhibitor (和光純薬工業)および0.5 μ gのランダムプライマー(6mer)を含む反応溶液中で37℃60分インキュベートして、cDNAを得た。

【0017】

・FGF-3及びFGF-7に共通なプライマーの作成

既知の7種類のヒトFGFのアミノ酸配列を比較し、FGF-3、FGF-7間でアミノ酸配列が同一である2箇所(Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser)を選び、図1に示す2種類のFGFプライマーを作成した。

【0018】

・ラットFGFファミリーDNAの増幅

ラット胎児cDNAを鋳型にし、上記の2種類のFGFプライマーとTaq DNA polymeraseを用いたpolymerase chain chain (PCR)法によりFGFファミリーDNAを増幅した。即ち、適当量のcDNA、0.05ユニット/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ(和光純薬工業)および5pmol/ μ lの前述のセンス-またはアンチセンスプライマーを含む反応溶液(25 μ l)を30サイクルのPCRに供した。反応後、溶液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望のサイズ(～110塩基対)のフラクションを電気泳動で溶出した。

【0019】

・ラットFGFファミリーDNAのスクリーニング

FGFプライマーにより増幅したFGFファミリーDNAをpGEM-T DNA vector (Promega) に挿入し、得られた組換えベクターを大腸菌 (XL1-blue株) に感染させ、DNAクローンを得た。cDNA配列の解析には、DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems Inc.) を用いた。

各DNAクローンの塩基配列を決定したところ、既知のFGF-3、FGF-7のcDNA以外にも、既知のFGFファミリーペプチドと類似のアミノ酸配列構造を持つ(～50%)ペプチドをコードしている新規なFGFcDNAが単離された。これを、FGF-10と命名した。

【0020】

・ラットFGF-10cDNAの全翻訳領域の構造解析

上記実験にて判明したFGF-10cDNAの部分構造から、プライマーを作成し、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法 [Frohman, PCR Protocols-A guide to methods and applications, Academic Press, pp. 28-38 (1990)] を利用して全翻訳領域を取得した。詳細は以下〔1〕～〔6〕に記述する。

【0021】

〔1〕 FGF-10cDNAの部分構造からプライマーA～D (図2、配列番号: 5、6、7および8) を作成し、また、RACE法用として、プライマーX及びY (図2、配列番号: 9および10) を作成した。〔2〕 ランダムヘキサオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてラット胎児mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した後、デオキシアデニン三リン酸の存在下に3'デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて3'末端にポリ(A)配列を付加した。このようにして得られたcDNAを鋳型としてプライマーBおよびXを用いてPCRを行った。さらに、プライマーAおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌 (XL1-blue

e) を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これを pFGF-10 (5') と命名した。〔3〕プライマーXを用いてラット胎児 mRNA を鋳型として逆転写酵素により cDNA を合成した。このようにして得られた cDNA を鋳型として、プライマーCおよびYを用いてPCRを行った。さらに、プライマーDおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片を pGEM-T に挿入し、大腸菌 (XL1-blue 株) を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これを pFGF-10 (3') と命名した。〔4〕pFGF-10 (5') より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10 (3') より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列より、各々プライマーEおよびF (図2、配列番号: 11および12) を作成した。〔5〕ラット胎児 mRNA を鋳型として、オリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により、cDNA 第一鎖を得た。これを鋳型としてプライマーEおよびFを用いてPCRを行った。得られた増幅断片を pGEM-T に挿入し、大腸菌 (XL1-blue 株) を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、pFGF-10 (5') より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10 (3') より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列を連続して保持するクローンが得られた。この中の1クローンを選び、pFGF-10 と命名した。このプラスミドに担持される全翻訳領域を含む FGF-10 cDNA を解析した。〔6〕以上の結果を総合して配列番号: 3 の塩基配列 (804bp) を決定した。

【0022】

・ラット FGF-10 の全アミノ酸配列の決定

上記実験で得られた FGF-10 cDNA の塩基配列より、FGF-10 cDNA の翻訳領域は 645bp からなり、FGF-10 は配列番号: 1 で示される 215 アミノ酸からなる新規 FGF であることが明らかになった。アミノ酸配列の検討から、N 末端にシグナル配列を有する分泌型の蛋白であることが分かった。マチュア部分は、37-215 位で、179 アミノ酸からなるポリペプチドと

目される。50-52位に存在するAsn-Ser-Ser、203-205位のAsn-Thr-Serは、糖鎖結合配列であり、FGF-10は糖鎖を有している可能性がある。

【0023】

〔実施例2〕ラットFGF-10の哺乳動物細胞での発現

・プラスミドの構築

プラスミドpFGF-10（図3）をSph IとPst Iで消化し、ポリアクリルアミド電気泳動によりcDNA全長を含む断片を単離した。この断片をpUC19のSph I、Pst I消化物とライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換することにより、FGF-10 cDNAを含むプラスミドpUC-F10を得た。pUC-F10をHind III 及びXba Iで消化することによりFGF-10 cDNAを含む断片を切出し、哺乳動物細胞発現ベクターであるpCDM8のHind III、Xba I消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/P3株を形質転換することにより、CMVプロモーターの支配下にFGF-10 cDNAを有するプラスミドpCDM8-F10SPを得た。

一方、FGF-10 cDNAにおける推定翻訳開始コドン上流の塩基配列がコザックのコンセンサス配列からはずれていることから、本mRNAの翻訳効率が良い可能性があることが考えられた。そこで、翻訳効率の向上を目的として、推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換する変異を導入することとした〔マリリン コザック (M. Kozak)、ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (The Journal of Cell Biology) 108巻 229-241頁 (1989. 2)〕。

変異の導入はPCRを利用し、pFGF-10を鋳型として 図4に示す、5'末端にHind III 切断部位およびコザックのコンセンサス配列を有するセンスプライマーと、5'末端にXba I切断部位を有するアンチセンスプライマーを用いることにより行った（反応条件は図4参照）。

反応終了後、PCR産物をフェノールクロロホルム処理、エーテル処理、ついでエタノール沈殿を行い、Hind III およびXba Iで消化した後、ポリアクリルアミド電気泳動により約700塩基対の断片を単離した。この断片を哺乳動

物細胞発現ベクターである pCDM8 の Hind III、Xba I 消化物とライゲーションし、大腸菌 MC1061/P3 株を形質転換して得られたコロニーの中から 4 クローンを選び、DNA シークエンサー（パーキンエルマー 373 型）を用いて塩基配列の解析を行った。

その結果、いずれのクローンも推定翻訳開始コドン上流の塩基配列はコザックのコンセンサス配列に置換されており、かつコードするアミノ酸配列に影響する変異は起きていなかったもので、これらの中から 1 クローンを選び、本プラスミドを pCDM8-F10HX と命名した。

【0024】

〔実施例 3〕 ラット FGF-10 発現可能なプラスミドによる COS-1 細胞の形質転換

実施例 2 で構築したラット FGF-10 発現可能なプラスミド、pCDM8-F10SP 及び pCDM8-F10HX を通常の方法に従って大量に調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心を 2 回行って精製した。これら 2 種類のプラスミド及びコントロールとして pCDM8 を用いて、電気パルス法により COS-1 細胞の形質転換を行った。形質転換された細胞は、リジンセファロースクロマト処理した牛胎児血清 10% を含有する DMEM で 24 時間培養された後、培地を無血清の DMEM に交換、さらに継続して 96 時間培養された。このようにして得た培養液を遠心後、その上清を分注し -80℃ で凍結保存した。

【0025】

〔実施例 4〕 *in situ* ハイブリダイゼーション法による軟骨における FGF-10 mRNA の発現の確認

・プローブの調製：FGF-10 cDNA を pGEM-T ベクターに組み込み、そのプラスミドを大腸菌 JM-109 にトランスフェクトした後、大量培養を行い、ファルマシア社の Flexi Prep kit を用いて純度の高い FGF-10 cDNA を精製した。パーキンエルマー 373A/DNA シークエンサーを用いて配列を確認したのち、ベーリンガー社の DIG/RNA ラベリング キット（SP6/T7）を用いて cRNA プローブを作成した。

【0026】

・切片作成：ウイスター系雌性ラットを3週令で屠殺後、大腿骨と脛骨を関節を保持した状態で摘出し、軟部組織を除去し、適当な大きさにトリミング後、素早く固定液（4%パラホルムアルデヒド）に浸し、4℃で一晩固定した。脱水後、脱灰液（10%EDTA、15%グリセロール-PBS）に浸し、4～5日間脱灰を行った（毎日、液は交換した）。その後、膝関節前後約2cmにトリミングし、O.C.Tコンパウンドに浸し、液体窒素にて凍結させ、クリオスタットを用いて厚さ10μmの関節組織切片を作製し、シランコーティングスライドガラスにマウントした。

・ハイブリダイゼーション：前述の関節組織切片の前処理（プロテイナーゼK消化、0.2M HClで内在性のアルカリフォスファターゼを不活化、0.1M TEA：0.25%無水酢酸でアセチル化）を行った後、エタノール系列で脱水し風乾した。そして前述のプローブをハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10mM Tris-HCl/pH7.6、200μg/ml tRNA、1×Denhardt's solution、10%Dextran sulfate、600mM NaCl、0.25%SDS）で10倍に希釈し、一切片当り50μl載せ、小さく切ったパラフィルムで覆い、50℃で16時間インキュベーションした。RNaseAで不要なプローブを消化しSSCで洗浄した後、抗体反応、発色反応を行った。

【0027】

・抗体反応および発色反応：プローブの洗浄が終わった切片をブロッキング液に60分浸した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（Anti-Digoxigenin-AP: Fab fragment：ペーリンガーマンハイム）を乗せ、37℃で1時間インキュベーションした。抗体液を洗った後、NBT、X-フォスフェイトを加え、37℃でインキュベーションし発色反応を行った（12時間）。発色を確認した後、発色停止液（10mM Tris-HCl/pH7.6、1mM EDTA/pH8.0）に漬け、蒸留水で洗った後、水性封入した。

・結果：図5（A）（B）に示すように軟骨細胞に発色が確認された。FGF-10のmRNAが軟骨細胞に発現していることから、FGF-10は軟骨に対す

る活性を有する骨および軟骨の損傷修復等に関与する因子であると推定される。

【0028】

〔実施例5〕FRSK細胞を用いた細胞増殖活性の検討

・細胞培養：ラットの上皮細胞であるFRSK細胞は、培養面積75平方cmの培養フラスコ当たり15mlの10%ウシ胎児血清を含むF-12培地を用いて、37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養した。細胞は7日に一度、1/10の割合で継代を行った。

・FGF-10蛋白の発現：FGF-10をCOS-1細胞で一過性に発現させ（実施例3参照）、その培養上清を以下のアッセイに供した（以下、pCDM8-F10SPを用いて得られた培養上清をFGF-10/Sp、pCDM8-F10HXを用いて得られた培養上清をFGF-10/Hx、コントロールプラスミドpCDM8を用いて得られた培養上清をBqと表示する）。

・DNA合成アッセイ（トリチウム標識チミジンの取込み）：細胞をサブコンフルエントまで培養した後、トリプシン処理により細胞を剥がし、上記培地を用いて10000細胞/mlに調整し、96穴プレートに100 μ lずつ播き込み、37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養を行った。2日に一度、培地を新しい上記培地100 μ lに交換し、7日間培養を行った後、培地を0.1%ウシ血清アルブミンを含むF-12培地100 μ lに交換した。24時間後、COS上清を25 μ l添加し、18時間37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養を行い、0.2 μ Ciのトリチウム標識チミジンを含むF-12培地20 μ lを添加、引続き同条件下で培養した。4時間後培地を除去し、2N NaOHを50 μ l添加して30分静置、細胞を死滅させた。1N HClで中和後、細胞をセルハーベスターで回収し、ベータプレートにてカウントを計測した。

・結果：図6に示すように、コントロール群：Bq（100%）と比較して、FGF-10発現群：Sp、HxはFRSK細胞のトリチウム標識チミジンの取込みを大きく増加させた（各々286%、501%）。FGF-10は上皮細胞の増殖を促進する因子であることが示唆される。

【0029】

〔実施例6〕ヒトFGF-10遺伝子の構造解析

・ヒト遺伝子ライブラリーの調製

市販のヒト肺ポリ(A)+RNA〔クロンテック (clontech) 社：カタログ番号6524、成人男性全肺由来〕を鋳型に、ランダムプライマー(6mer)をプライマーとして、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素を用いてヒト肺cDNAを調製した。すなわち、ヒト肺ポリ(A)+RNA(5 μ g)を300ユニットのMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO-BRL)、15ユニットのhuman placenta RNase inhibitor (和光純薬工業)および0.5 μ gのランダムプライマー(6mer)を含む反応溶液中で37℃60分インキュベートして、cDNAを得た。

【0030】

・ヒトFGF-10遺伝子増幅用プライマーの作成およびヒトFGFファミリーDNAの増幅

実施例1で使用した、図1に示す2種類のFGFプライマー(Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser)を選び、ヒトFGF-10遺伝子増幅に用いた。

ヒト肺cDNAを鋳型にし、上記の2種類のFGFプライマーとTaq DNA polymeraseを用いたpolymerase chain chain (PCR)法によりFGFファミリーDNAを増幅した。即ち、適当量のcDNA、0.05ユニット/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ(和光純薬工業)および5 pmol/ μ lの前述のセンスまたはアンチセンスプライマーを含む反応溶液(25 μ l)を30サイクルのPCRに供した。反応後、溶液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望のサイズ(～110塩基対)のフラクションを電気泳動で溶出した。

【0031】

・ヒトFGFファミリーDNAのスクリーニング

FGFプライマーにより増幅したFGFファミリーDNAをpGEM-T DNA vector (Promega)に挿入し、得られた組換えベクターを大腸菌

(XL1-blue株)に感染させ、DNAクローンを得た。cDNA配列の解析には、DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems Inc.)を用いた。

各DNAクローンの塩基配列を決定したところ、ラット型FGF-10と同一の配列を有するペプチドをコードするcDNAが増幅されていた。この遺伝子はヒトFGF-10をコードするものと考えられた。

【0032】

・ヒトFGF-10 cDNAの全翻訳領域の構造解析

実施例1と同じ方法でヒトFGF-10全翻訳領域を含むcDNAを増幅及び解析し、配列番号：4の塩基配列を決定した。詳細は以下〔1〕～〔6〕に示す。

【0033】

〔1〕ヒトFGF-10 cDNAの部分構造からプライマーA' およびD' (図2、配列番号：13および14)を作成した。プライマーB、C、XおよびY (図2、配列番号：5、6、7および8)は実施例1で使用したものを流用した。用いた。〔2〕ランダムヘキサオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてヒト肺mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した後、デオキシアデニン三リン酸の存在下に3' デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて3' 末端にポリ(A)配列を付加した。このようにして得られたcDNAを鋳型としてプライマーA' およびXを用いてPCRを行い、さらに、プライマーBおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue)を形質転換することにより、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをphFGF-10(5')と命名した。〔3〕プライマーXを用いてヒト肺mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した。このようにして得られたcDNAを鋳型として、プライマーCおよびXを用いてPCRを行った。さらに、プライマーD' およびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue株)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをphFGF-10(3')と命名した。〔4〕phFGF-10(5')

より得られた翻訳領域上流部分の塩基配列は、ラット型遺伝子と同じ配列を含んでいたため、5'側のプライマーとしてプライマーE（図2：配列番号12）を流用した。また、p h F G F-10（3'）より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列から、3'側のプライマーとして新たにプライマーF'（図2：配列番号15）を作成した。〔5〕ヒト肺mRNAを鋳型として、オリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により、cDNA第一鎖を得た。これを鋳型としてプライマーEおよびF'を用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌（XL1-blue株）を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、p h F G F-10（5'）より得られた翻訳領域上流部分の塩基配列と、p h F G F-10（3'）より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列を連続して保持するクローンが得られた。この中の1クローンを選び、p h F G F-10と命名した。このプラスミドに担持される全翻訳領域を含むヒトFGF-10 cDNAを解析した。〔6〕以上の結果を総合し、配列番号：4の塩基配列（690bp）を決定した。

【0034】

・ヒトFGF-10の全アミノ酸配列の決定

上記実験で得られたcDNAの塩基配列より、ヒトFGF-10 cDNAの翻訳領域は624bpからなり、ヒトFGF-10は配列番号：2で示される208アミノ酸からなるポリペプチドであることが明らかになった。また、アミノ酸配列の検討から、N末端にシグナル配列を有する分泌型の蛋白であることが分かった。マチュア部分は、38-208位で、172アミノ酸からなるポリペプチドと目される。51-53位に存在するAsn-Ser-Ser、196-198位のAsn-Thr-Serは、糖鎖結合配列であり、この部位に糖鎖を有している可能性がある。

特平 8-103240

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：215

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ラット

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu

1 5 10 15

Pro Gly Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser Val

20 25 30

Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu Ala

35 40 45

Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe

50 55 60

Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu

65 70 75 80

Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe

85 90 95

Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn

100 105 110

Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val

115 120 125

Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys

130 135 140

Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys

特平 8-103240

145 150 155 160
Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp
 165 170 175
Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala
 180 185 190
Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe
 195 200 205
Leu Pro Met Val Val His Ser
 210 215

【0036】

Sumi #2

配列番号：2

配列の長さ：208

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
1 5 10 15
Pro Gly Cys Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
 20 25 30
Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
 35 40 45
Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
 50 55 60
Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
65 70 75 80

特平 8-103240

Lys	Leu	Phe	Ser	Phe	Thr	Lys	Tyr	Phe	Leu	Lys	Ile	Glu	Lys	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Cys	Pro	Tyr	Ser	Ile	Leu	Glu
			100					105					110		
Ile	Thr	Ser	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Ser
			115				120						125		
Asn	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Lys
			130				135				140				
Glu	Phe	Asn	Asn	Asp	Cys	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Asn	Gly
145					150					155				160	
Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn	Trp	Gln	His	Asn	Gly	Arg	Gln	Met
				165					170					175	
Tyr	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Lys	Gly	Ala	Pro	Arg	Arg	Gly	Gln	Lys	Thr
			180					185					190		
Arg	Arg	Lys	Asn	Thr	Ser	Ala	His	Phe	Leu	Pro	Met	Val	Val	His	Ser
			195					200					205		

【0037】

配列番号：3

配列の長さ：804bp

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ラット

存在位置：109-753

特徴を決定した方法：E

配列

TAACCAGTAG CCATCACCTC CAGCTGTCTC TTTGCCTCGC ACCAGGTCTT ACCCTTCCAG 60
TATGTTTCCTT CTGATGAGAC AATTTCCAGT GCCGAGAGTT TCAGTACA ATG TGG AAG 117
TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCG GGC TGC 165
TGT TGC TGC TTC TTG TTG CTC TTC TTG GTG TCT TCC GTC CCT GTC ACC 213
TGC CAA GCT CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCG GAG GCT ACC AAC TCC 261
TCT TCC TCC TCC TCT TCC TCC TCC TCG TCC TCT TCC TTC TCC TCT CCT 309
TCC AGC GCG GGG AGG CAT GTG CGG AGC TAC AAT CAC CTC CAG GGA GAT 357
GTC CGC TGG AGA AAG CTG TTC TCC TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT 405
GAA AAG AAC GGC AAG GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAA AAC TGT CCG TAC 453
AGT ATC CTA GAG ATA ACA TCA GTG GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA 501
GCC ATT AAC AGC AAC TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC 549
TAT GGC TCA AAA GAA TTT AAC AAT GAC TGT AAA CTG AAA GAG AGG ATA 597
GAG GAA AAT GGA TAC AAC ACC TAT GCA TCT TTT AAC TGG CAG CAC AAC 645
GGC AGG CAA ATG TAT GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCC AGG AGA 693
GGA CAA AAA ACA AGA AGG AAA AAC ACC TCC GCT CAC TTC CTC CCC ATG 741
GTG GTC CAC TCA TAGAAGA AGGCACCGTT GGTGGATGCA GTACAACCAA TGA CTCTTTG 800
CCAA

【0038】

配列番号：4

配列の長さ：690bp

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

配列

CTTCCAGTAT GTTCCTTCTG ATGAGACAAT TTCCAGTGCC GAGAGTTCCA GTACA ATG 58

特平 8-103240

TGG AAA TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCC	106
GGC TGC TGC TGC TGC TGC TTT TTG TTG CTG TTC TTG GTG TCT TCC GTC	154
CCT GTC ACC TGC CAA GCC CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCA GAG GCC	202
ACC AAC TCT TCT TCC TCC TCC TTC TCC TCT CCT TCC AGC GCG GGA AGG	250
CAT GTG CGG AGC TAC AAT CAC CTT CAA GGA GAT GTC CGC TGG AGA AAG	298
CTA TTC TCT TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT GAG AAG AAC GGG AAG	346
GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAG AAC TGC CCG TAC AGC ATC CTG GAG ATA	394
ACA TCA GTA GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA GCC ATT AAC AGC AAC	442
TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC TAT GGC TCA AAA GAA	490
TTT AAC AAT GAC TGT AAG CTG AAG GAG AGG ATA GAG GAA AAT GGA TAC	538
AAT ACC TAT GCA TCA TTT AAC TGG CAG CAT AAT GGG AGG CAA ATG TAT	586
GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCA AGG AGA GGA CAG AAA ACA CGA	634
AGG AAA AAC ACC TCT GCT CAC TTT CTT CCA ATG GTG GTA CAC TCA TAGAG	684
GAAGGC	690

【0039】

配列番号：5

配列の長さ：22bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GATGCATAGG TATTGTATCC AT

配列番号：6

配列の長さ：21bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

特平 8-103240

TCCATTTTCC TCTATCCTCT C

配列番号：7

配列の長さ：20 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

AGAAGGGGAA ACTCTATGGC

配列番号：8

配列の長さ：21 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GACTGTAAAC TGAAAGAGAG G

配列番号：9

配列の長さ：32 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GCGAGCTCAA GCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TT

配列番号：10

配列の長さ：18 bp

配列の型：核酸

特平 8-103240

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GCGAGCTCAA GCTTTTTT

配列番号：1 1

配列の長さ：20 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

CTTCCAGTAT CATCCTTCTG

配列番号：1 2

配列の長さ：20 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGCAAAGAGT CATTGGTTGT

配列番号：1 3

配列の長さ：22 bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GATGCATAGG TATTGTATCC AT

配列番号：14

配列の長さ：22bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GAAACTCTAT GGCTCAAAAG AA

配列番号：15

配列の長さ：20bp

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GTACACTCAT AGAGGAAGGC

【0040】

【図面の簡単な説明】

【図1】FGF-10遺伝子のクローニングに用いた2種類のFGF-3、FGF-7、FGF-10共通プライマー、(A) Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、(B) Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Serを示す。

【図2】Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法に用いたFGF-10 cDNA単離用プライマーを示す。

【図3】プラスミドpFGF-10から、プラスミドpCDM8-F10SPおよびpCDM8-F10HXを得るまでのプラスミド構築方法の概略。

【図4】翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーおよびPCR反応条件。

【図5】in situ ハイブリダイゼーション法によるラット関節組織におけるFGF-10 mRNAの発現。(A)：関節軟骨標本の顕微鏡写真。

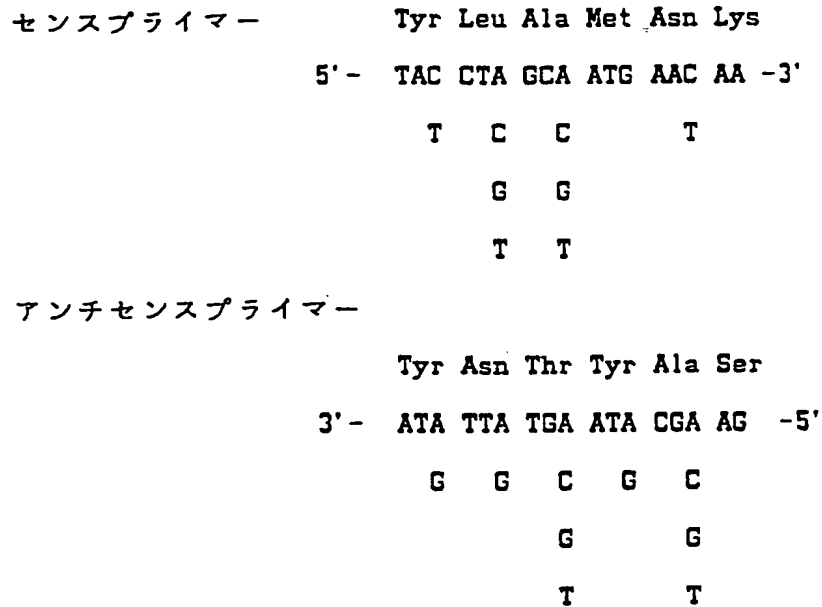
(B) : 骨端軟骨板の顕微鏡写真。

【図6】トリチウム標識チミジンのFRSK培養細胞への取込みを示すグラフ。
横軸Bqはコントロール、Sp、HxはそれぞれFGF-10発現COS細胞の
培養液を加えた場合を示す。縦軸は細胞内の放射活性を示す。

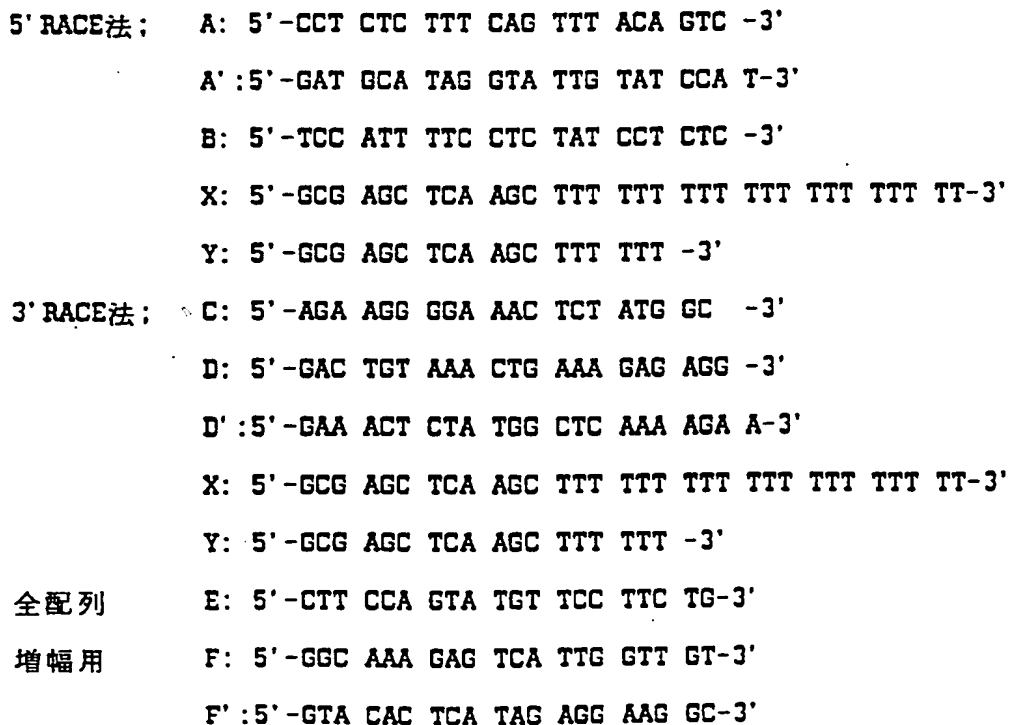
【書類名】

図面

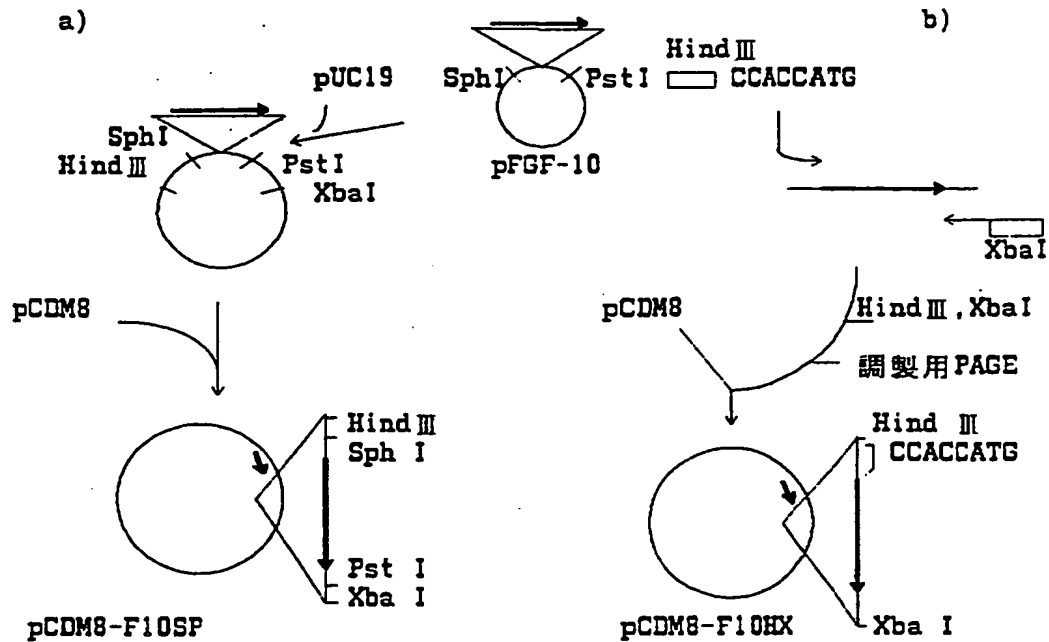
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーの塩基配列

名称	塩基数	配列(5' → 3')
F10HS	35mer	TTTAAAGCTT CCACC ATGTGGAAGTGGATACTGAC
F10XR	27mer	AAAATCTAGA GTCATTGGTTGTACTGC

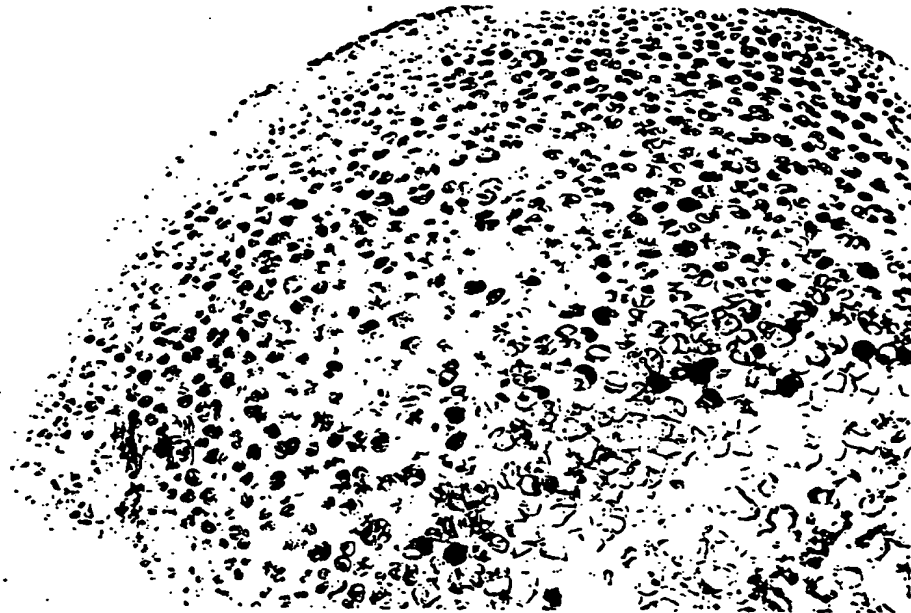
反応条件:

pFGF-10(0.5 μg/μl)	2	μl
10xPCR buffer	10	
10 μM F10HS	2.5	
10 μM F10XR	2.5	
dNTP mix(TaKaRa)	8	
dH2O	74.5	
AmpliTaq	0.5	/100 μl

94℃	30 秒] x 10回
94℃	60 秒	
56℃	60 秒	
72℃	60 秒	
72℃	9 分	

変異導入切片

【図5】

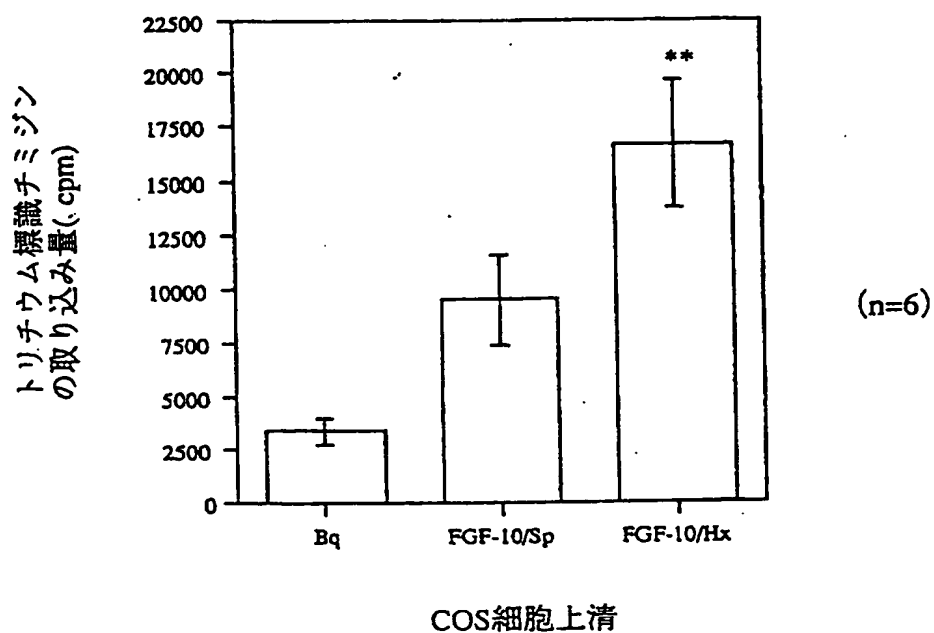


(A) 関節軟骨の薄切り組織標本の顕微鏡写真



(B) 骨端軟骨板の薄切り組織標本の顕微鏡写真

【図6】



COS細胞上清添加後のFRSK細胞によるトリチウム標識チミジンの取り込み量の変化。
 値は平均±標準誤差で、有意差はBqに対して**； $P<0.01$ で示した。

特平 8-103240

整理番号 132293

【書類名】要約書

【要約】

【課題】新規なアミノ酸配列構造を有する線維芽細胞増殖因子FGF-10をコードするDNA、および組換蛋白とその製法を提供する。

【構成】特定のアミノ酸配列をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを、宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養して蛋白を産生させ、組換FGF-10を得る。

【効果】FGF-10は、細胞増殖作用を利用した医薬、実験試薬として応用し得る。

【選択図】なし

特平 8-103240

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000183370

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】

住友製薬株式会社